

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

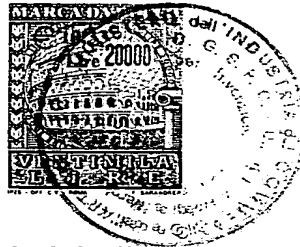


MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

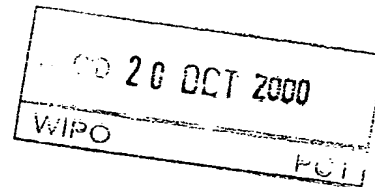
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

IB 00/01280



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI99 A 001894



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 3 01.10.2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

DI CARLO

A. RICHIEDENTE (I)

N.G.

1) Denominazione Dr. Carlo Ghisalberti
 Residenza Via Piero della Francesca 6 20154 Milano GHSCRL60HI7Z602U
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____



E. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome _____ cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza _____
 via _____ n. _____ città _____ (prov) _____

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

Dr. Carlo Ghisalberti
 via Piero della Francesca n. 6 città Milano cap 20154 (prov) MI

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo _____

ACIDO LINOLEICO CONIUGATO E TRIGLICERIDE, NUOVI METODI DI
SINTESI E D'USO

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Ghisalberti Carlo 3) _____
 2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
 2) _____

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ PROV n. pag. 20 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) ☐ PROV n. tav. _____ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare
 Doc. 3) ☐ RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
 Doc. 4) ☐ RIS designazione inventore
 Doc. 5) ☐ RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) ☐ RIS autorizzazione o atto di cessione
 Doc. 7) ☐ _____

nominativo completo del richiedente

365.000 (TRECENTO SESSANTACINQUEMILA)

8) attestati di versamento, totale lire

obbligatorio

COMPILATO IL 08 09 1999

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

CONTINUA S/NO noDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO no

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANOcodice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI99A 001894

Reg. A

L'anno millenovecento

NOVANTANOVE

il giorno

NOVE

del mese di

SETTEMBREil (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Carlo Ghisalbertitimbro
dell'ufficioL'UFFICIALE ROGANTE
M. COLOSIMO

DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto d'INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo:

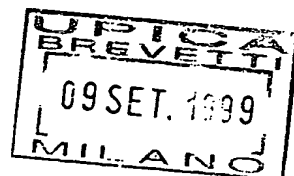
ACIDO LINOLEICO CONIUGATO E TRIGLICERIDE, NUOVI METODI DI SINTESI E D'USO

A nome: Dr. Carlo Ghisalberti, Via Piero della Francesca 6 - 20154 Milano (I)

Inventori designati: Carlo Ghisalberti

Mandatari: -

Depositato il 09-09-1999



DESCRIZIONE

L'invenzione si riferisce alla sintesi di acido linoleico coniugato (CLA) libero mediante isomerizzazione alcalina di oli vegetali in mezzo glicerico, nonché del CLA ottenuto da olio di vinacciolo, nonché alla sintesi di CLA trigliceride a partire dall'olio di ricino per eliminazione di un gruppo 12-alchil- o -aril-solfonico precedentemente formato.

L'invenzione si riferisce inoltre a metodi di trattamento topico ed orale mediante preparazioni dietetiche e composizioni cosmetiche a base di CLA libero o trigliceride.

La denominazione di CLA comprende una miscela di isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico. Il CLA si ritrova in alimenti di origine animale, in particolare nella carne bovina e nei prodotti caseari, ma comunque in quantità estremamente limitate e tali da renderne impraticabile per fini commerciali l'estrazione-purificazione da fonti naturali.

Il CLA disponibile in commercio è generalmente prodotto per isomerizzazione alcalina di oli vegetali ad elevate temperatura in presenza di un solvente, ad esempio dietilenglicole, glicole etilenico o propilenico.

Tipicamente tale CLA è formato per circa il 60-70% dagli acidi c9,t11-, t10,c12-, t9,t11- e t10,t12- ottadienoici; per il 5-7% dagli isomeri c9,c11-, t9,c11-, c10,c12-, e c10,t12; e per il 28-33% dagli acidi grassi monoinsaturi (acido oleico, elaidico e palmitoleico) e saturi (acido miristico, palmitico e stearico) inizialmente presenti.

Al termine dell'operazione la miscela di reazione è addizionata con acqua, neutralizzata con acido minerale, infine estratta con solvente etero, seguita da separazioni delle fasi e distillazione del solvente.

Tuttavia il prodotto può contenere ancora quantità apprezzabili del solvente di reazione (esempio dietilenglicole) oltre a tracce residuali di etere o esano, pertanto può essere caratterizzato dalla presenza di contaminanti.

Abbiamo sviluppato un procedimento di isomerizzazione alcalina caratterizzato dall'uso della glicerina, mirato cioè ad ovviare agli inconvenienti sopra citati, per produrre un CLA per uso topico ed orale.

Nel procedimento della presente invenzione un olio vegetale ad alto contenuto di acido linoleico e la glicerina vengono caricati in reattore in rapporto ponderale a 0,5:1 a 4:1, (da 1 a 5 equivalenti in acidi grassi), si inertizza con azoto o argon, si riscalda fino a temperature da 200 a 240 °C, preferibilmente nell'intorno superiore, per tempi variabile da 2 a 6 ore, in funzione della temperatura. A 230 °C sarà sufficiente un tempo di reazione di circa 2,5 ore, per ottenere una conversione superiore al 98% dell'acido linoleico in CLA.

Si procede quindi al raffreddamento, con aumento della viscosità dai saponi dei CLA, e a circa 90 °C, si immette un volume d'acqua, riscaldando per eliminare i monogliceridi presenti (5% circa).

Quindi si neutralizza l'intera massa con acido solforico o HCl (tra 10 e 50% p/v), lasciando separare le fasi per 6-12 ore, fino a separazione degli acidi grassi come fase superiore, che sono quindi lavati con acqua, oppure trattati in corrente di vapore, ed eventualmente essiccati, filtrati o centrifugati, deodorizzati e/o chiarificati secondo procedimenti noti.

Le rese di conversione acido linoleico-CLA del procedimento della presente invenzione sono nell'ordine del al 70-80% a 200°C per 4-5 ore, e fino al 98% a 230°C in 3-4 ore. A temperature superiori a 235°C possono avere inizio reazioni di decomposizione o dimerizzazione, mentre a 245°C si avverte la formazione di acroleina.

Le materie prime preferibilmente utilizzate nel presente procedimento sono oli vegetali ad alto contenuto di acido linoleico, quali l'olio di girasole, di carcamo, o di mais, in forma di gliceridi o altri esteri, acidi grassi liberi, o loro miscele.

Sorprendentemente non era noto, fino alla presente invenzione, un CLA ottenuto da olio di vinacciolo.

L'olio di vinacciolo contiene la maggior quantità di acido linoleico, 72-76%, superiore all'olio di cartamo (70-72%), di girasole (60-62%), e di mais (circa 52%), a

fronte del minimo contenuto in acido linolenico, la cui isomerizzazione porta a prodotti altoinsaturi coniugati di dubbia validità metabolica.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è pertanto il CLA per uso topico ed orale ottenuto a partire da olio di vinacciolo mediante isomerizzazione alcalina in presenza di un qualsiasi solvente con punto di ebollizione superiore a 240 °C.

Un CLA particolarmente preferito per i nostri scopi può essere ottenuto dall'acido ricinoleico, fornendo un CLA in alta purezza chimica e configurazionale, con una composizione che non differisce sostanzialmente da quella riscontrata nei tessuti biologici.

Un esempio di procedimento per la preparazione di un CLA relativamente puro è descritto da Berdeaux et al, in JAOCS, 74, 8, 1011-1015, 1997, e prevede l'eliminazione dei solfonati di ricinoleato di metile a dare una miscela composta prevalentemente dagli acidi c9,t11- c9,c11- c9,t12- ottadienoici in proporzione relativa di 10:3:1.

In talune applicazioni topiche o orali sarebbe opportuno disporre del trigliceride di CLA, eliminando l'inconveniente dell'acidità dovuta CLA in forma libera.

Il trigliceride del CLA può, in linea di principio, essere prodotto con metodi noti, qual'è la transesterificazione di un estere glicerico, ad esempio per azione del sodio metallico su una miscela composta da triacetina e dal CLA-metilestere.

Per ottenere direttamente e convenientemente un trigliceride del CLA ad elevata purezza per uso topico ed orale, abbiamo sviluppato un efficiente procedimento industriale, consistente nella formazione del 12-tosilato del trigliceride di ricino, selettivamente convertiti da ammine terziarie in trigliceride al 90% di CLA, contenente esclusivamente gli acidi c9,t11-, e c9,c11- ottadienoici in rapporto da 4:1 a 5:1.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è pertanto un trigliceride di CLA ad elevata ottenuto a partire dall'olio di ricino per eliminazione di un gruppo 12-alchil o 12-aril solfonico precedentemente formato.

Il CLA è stato inizialmente studiato con particolare interesse per la capacità di inibizione del carcinoma mammario e alla prostata, con meccanismi non del tutto chiari, in parte attribuiti alla capacità di modulazione dell'attività di linfociti e macrofagi.

Dopo aver attratto l'attenzione per le sue proprietà antineoplastiche, il CLA è nuovamente al centro dell'attenzione per vari effetti biologici positivi sugli organismi superiori, ad esempio l'azione anti-aterogénica, anti-iperinsulinemica e dimagrante.



Le ricerche di tipo accademiche, in questo caso, si sovrappongono ad una serie di brevetti rivendicanti l'uso dietologico-curativo del CLA.

Tuttavia, abbiamo scoperto che la somministrazione orale di prodotti dietetici a base di CLA porta ad un'elevazione dello stress perossidativo, con aumento dei noti rischi connesso alla formazione di lipoperossiradicali.

Ciò si spiega per il fatto che il CLA è una molecola reattiva, in grado di combinarsi facilmente con l'ossigeno a produrre il radicale perossido (LOO°), quindi trasformato in idroperossido (LOOH), che successivamente produce L° (la propagazione di catena) e un perossido ciclico. Il perossido ciclico tende infine a isomerizzare a endoperossido ciclico e questi a reagire con l'ossigeno singoletto (O_2°), a formare malondialdeide ed altri frammenti lipidici ossigenati, in grado di propagare la catena lipoperossidativa.

Abbiamo scoperto che tale fenomeno lipoossidativo viene inibito dalla presenza concomitante nell'organismo di sufficienti quantità di antiossidanti.

La presente invenzione ha quindi come ulteriore oggetto un metodo per la somministrazione orale del CLA in combinazione con antiossidanti dieteticamente accettabili.

Il metodo, in grado di apportare i benefici tipici del lipide metabolico in oggetto (CLA), consiste nella somministrazione di una preparazione dietetica contenente :

- i) CLA in forma di acido libero o trigliceride, in quantità compresa tra 0,01 e 50% in peso della preparazione;
- ii) Antiossidanti dieteticamente accettabili, in quantità tale che il rapporto ponderale antiossidante : CLA sia compreso tra 1:2 e 5:1;
- iii) Nutrienti ed eccipienti dieteticamente accettabili, per la restante parte della preparazione;

Gli antiossidanti adatti al nostro scopo includono, non limitatamente, gli antiossidanti contenuti nei semi, nelle foglie, nei fiori e nella corteccia di frutta e vegetali, e possono essere di origine estrattiva da fonti naturali o gli equivalenti di provenienza sintetica.

Antiossidanti rappresentativi sono alcuni amminoacidi (ad esempio istidina e valina), i flavonoidi (ad esempio, armadendrina, morina, quercetina, esperetina, naringenina, chempferolo, apigenina, luteolina, fosetina, fustina, rutina, miricetina), gli

antociani (ad esempio pelargonidina, cianidina, delphinidina), le catechine (ad esempio catechina, epicatechina, gallocatechina, proantocianosidi), i carotenoidi e retinoidi (isomeri del carotene, licopene, zeaxantina, retinolo, cataxantina), i tocoferoli (ad esempio alfa- beta- e gamma-tocoferolo), i tannini (ad esempio acido gallico, propil gallato e esteri gallici, acido tannico), i fosfolipidi (ad esempio lecitina da uovo e da soia), acido L-ascorbico ed esteri, gli alfaidrossiacidi (ad esempio acido lattico, acido citrico, acido L-tartarico), i polichetidi da rosso di Monascus, le sostanze dall'arachide e dal riso (ad esempio cardanolo, cardolo, acido anacardico, orizanolo, olio di anacardio), acido tioidipropionico ed estere laurilico (DLTBP), acido alfa-lipoico, acido nordiidroguaiaretico (NDGA), guaiacolo, idrossitirosolo ed esteri dall'oliva (ad esempio oleuropeina, verbascoside), altri fenoli da spezie ed erbe (ad esempio da rosmarino, chiodi di garofano, peperoncino, cannella, zenzero, paprika (TBHQ), oli agrumari, triidrossibutirrofeno (THBP), BHT e BHA), maclurina, etossichina, acido ellagico, musizina, boldina, nonché i loro corrispondenti glicosidi, esteri ed eteri, e loro combinazioni.

Le preparazioni dietetiche a base di CLA ed antiossidanti naturali possono essere utilizzate come integratori dietetici o preparazioni farmaceutiche, essendo preferenzialmente somministrate in forme dosate, quali compresse e capsule.

Dette preparazioni dietetiche possono essere in forma di emulsione o preparato per lo sportivo, alimento per l'infanzia, prodotto lattiero-caseario, soluzione alcolica, o altro formulato destinato all'alimentazione umana.

Le preparazioni dietetiche sono somministrate per os preferibilmente in un dosaggio da 10 a 50 mg di CLA per kg di peso corporeo.

Il dosaggio giornaliero ottimale delle composizioni è in funzione del peso corporeo e tale da fornire al soggetto la quantità di CLA necessaria al trattamento preventivo delle forme di aterosclerosi, diabetiche, oncologiche, o al trattamento per lo sport, immunostimolante e dimagrante tipiche dell'assunzione del CLA.

Le composizioni sono preferibilmente somministrate 1-3 volte al giorno in compresse o capsule contenente 500-1000 mg di CLA libero o trigliceride e 250-5000 mg di antiossidanti naturali, preferibilmente evitando di assumere dosaggi complessivi superiori a 3000 mg/CLA pro die.

L'applicazione dermatologica del CLA è limitata ad oggi ai sali di zinco, come descritto nel brevetto PCT-09817269, riguardante la preparazione di composizioni utili nel trattamento di disordini della pelle: eczema, forme psoriatiche e dermatitiche.

Abbiamo sorprendentemente scoperto che gli effetti topici dell'uso del CLA
5 conduce ad un miglioramento significativo della condizione cellulitica.

Il fenomeno dei rilievi della pelle, delle cosce e delle natiche è definito comunemente "cellulite", una dermoipodermosi con panniculopatia edemato-sclerotica nelle quali la reazione fibroblastica ha il sopravvento sugli scambi vascolari. Come osservato da Rosenbaum M et al. (Surg. of Plast Reconstr., 101(7):1934-9 1998) le
10 biopsie e la sonografia in vivo della coscia cellulitica mostra una diffusione del tessuto adiposo nel reticolo dermatico.

Abbiamo ora scoperto che l'applicazione topica del CLA accelera la riduzione di depositi grassi localizzata nelle aree cellulitiche, ottenendosi pertanto vantaggi significativi nella trattamento del difetto estetico.

15 La presente invenzione ha quindi come ulteriore oggetto un metodo per il trattamento della condizione cellulitica mediante composizioni cosmetiche contenenti CLA libero o trigliceride.

Le prove condotte su donne con condizioni dermatologiche sane, ma con aree a diffusione cellulitica, non hanno evidenziato alcun fenomeno irritativo o di intolleranza,
20 essendo inoltre il CLA particolarmente indicato per le sue proprietà chimico-fisiche: alta compatibilità cutanea, completa solubilità nella fase oleosa delle composizioni cosmetiche, elevata capacità di assorbimento (penetrazione) attraverso lo strato corneo.

L'attività anti-cellulitica sembra essere dovuta ad una riduzione del deposito adiposo ed aumentata lipolisi negli adipociti. Si postula un meccanismo di intervento
25 nell'immagazzinamento lipidico, laddove il CLA provocherebbe la mobilitazione delle riserve lipidiche, per aumento dell'attività ormonale lipasi-sensibile e per inibizione delle lipoproteine lipasiche.

Più consistente ci appare l'ipotesi di un'azione di inibizione della fase proliferativa degli adipociti, come risulterebbe dalle sperimentazioni condotte da Satory DL e Smith SB
30 (J Nutr, 82, 1, 92-7, 1999) e da Brodie AE et al (J Nutr, 129, 3, 602-6, 1999).

Inoltre, essendo accertato che al fenomeno della formazione di cellulite concorrono

Cellulite

fenomeni di tipo infiammatorio, su tale meccanismo sarebbero efficacemente attive le note proprietà anti-PGE possedute dal CLA.

La presente invenzione può prevedere un metodo di trattamento intensivo della cellulite a base di CLA e/o del corrispondente trigliceride, che può essere utilizzato come
5 tale, nelle concentrazioni da 60 a 90% in peso.

L'uso cosmetico può tuttavia beneficiare di altri ingredienti in grado di migliorare l'apparenza delle zone cosmetiche, di facilitare la penetrazione del CLA e/o di incrementare l'efficacia del trattamento anti-cellulitico. Un altro oggetto inventivo è
10 pertanto costituito dalle composizioni cosmetiche che contengono CLA in forma di acido grasso libero o di trigliceride, con un contenuto tra 0,5% e il 50% in peso, preferibilmente tra 1 e 5% da peso.

In una realizzazione preferita della presente invenzione, il CLA è utilizzato in combinazione con altre sostanze anti-cellulitiche.

Data l'incertezza eziologica, l'inestetismo cellulitico è trattato con una varietà di
15 ingredienti attivi che agiscono con meccanismi diversi. Le combinazioni con altre sostanze anti-cellulite comprendono quelle citate dagli autori Di Salvo in "Controlling the Appearance of Cellulite: AHAs and Cellulite Products" (C & T Ingredient Resource Series, 21-27) e Curri in "Local Lipodystrophy and Districtual Microcirculation" (Cosmetics and Toiletries, 109, 51-53, Settembre 1994), ivi citate come riferimento.

20 Esempi di anti-cellulitici particolarmente preferiti sono le xantine, in particolare la teofillina e la caffeina per la loro disponibilità e efficacia ottimali, ad esempio presenti da 0,5% a 3,0% in peso della composizione, tale da massimizzare efficacia e costo.

Altri esempi di anti-cellulitici sono gli stimulatori della sintesi del collagene, ad esempio l'acido betulinico, gli ascorbati, i triterpenoidi della Centella asiatica, l'inositol
25 fosfato e l'acido fitico, i vasodilatatori - che migliorano la scarsa vascolarità associata ad aree cellulitiche - ad esempio i ginsenosidi, l'edera, il minoxidil, il metilnicotinato, inoltre il salicilato, gli antagonisti alfa2-adrenergici e gli agonisti beta-adrenergici.

Altri esempi di anti-cellulitici sono ulteriori agenti lipolitici, che possono agire con meccanismi sinergici a quello del CLA nella mobilitazione dei depositi adiposi, ad esempio
30 gli estratti da Polygala tenuifolia, da Platycodon grandiflorum, da Hibiscus abelmoschus, da Kochia scoparia, ecc.



Un'altra combinazione preferita del CLA nella presente invenzione è costituita dagli alfa idrossi acidi, preferibilmente gli acidi monocarbossilici, ad esempio l'acido lattico, l'acido glicolico, l'acido mandelico, e loro miscele, per aumentare l'assorbimento percutaneo. La quantità di alfa idrossiacidi contenuti nella composizione secondo la
5 presente invenzione varia da 1,5 a 15%, più preferibilmente da 3 a 12% in peso.

Altri tipi di ingredienti attivi sono considerati nella presente invenzione. Sebbene non limitato a queste categorie, degli esempi generali includono gli antirughe, gli anti-infiammatori ed i depigmentanti cutanei.

Esempi di anti-infiammatori sono i derivati glicirrizinici, i flavonoidi, l'alfa-bisabololo, l'acido rosmarinico, l'azulene, l'asiaticoside, la ruscogenina, l'escina, l'acido betulinico e i suoi derivati. Esempi di depigmentanti sono l'idrochinone, l'arbutina, e l'acido cogico. Esempi di antirughe sono il retinolo e suoi derivativi, il tocoferolo e i suoi derivativi, i salicilati e derivativi.
10

Un altro ingrediente opzionale preferito è scelto tra gli acidi grassi essenziali - per favorire la biosintesi lipidica epidermica e fornire i lipidi della barriera epidermica - scelti preferibilmente tra l'acido linoleico, gamma-linolenico, omo-gamma-linolenico, columbinico, eicosa-(n-6,9,13)-trienoico, arachidonico, gamma-linolenico timnodonico, esaenoico, e loro miscele.
15

Le composizioni cosmetiche secondo l'invenzione possono comprendere un veicolo cosmeticamente accettabile che agisce nella composizione cosmetica come diluente, disperdente o vettore del CLA in forma di acido grasso libero o come trigliceride.
20

La quantità di tale veicolo può variare da circa 50% a circa 99,95%, preferibilmente da circa 80% a 99,5% in peso della composizione totale. Veicoli non acquosi possono includere emollienti liquidi o solidi, siliconi e solventi.

Ulteriori ingredienti cosmetici possono essere incorporati anche nelle composizioni cosmetiche, ad esempio tensioattivi ed emulsionanti a formare emulsioni o/a o a/o. Altri ingredienti possono includere addensanti, conservanti, emollienti, filtri solari, pigmenti, opacizzanti e profumi.
25

Le composizioni cosmetiche per il trattamento cutaneo dell'invenzione possono essere formulate in forma di soluzione, lozione, crema o gel, e confezionate in un contenitore appropriato in base alla viscosità e alla comodità d'uso da parte del
30

consumatore. Una forma fluida può essere confezionata in flacone o in applicatore roller-ball, mentre una crema consistente può essere semplicemente confezionata in tubetto o in vasetto.

5 Gli esempi seguenti illustrano in maniera preferenziale l'invenzione, non essendo intesi a limitarne gli scopi.

Esempio Preparativo I – Sintesi di CLA da olio di vinacciolo in glicerina

10 In reattore riscaldabile da 1 litro munito, provvisto di un termometro e di un gorgogliatore collegato ad una bombola di azoto, si caricano 100 g di olio di vinacciolo chiarificato, quindi 35 g di potassa caustica 85% e 100 g di glicerina bidistillata.

Si procede al riscaldamento fino a 220°C, mantenendo la massa bladamente agitata. Al termine si lascia raffreddare fino a 90°C, la massa tende ad assumere una viscosità elevata, si aggiunge un volume d'acqua, scaldando per circa mezz'ora, ed infine acido solforico 50% in varie porzioni fino a reazione acida (pH 3) della fase acquosa.

15 La fase oleosa sovrastante viene decantata per 12 ore, separata, quindi insufflata con vapore, filtrata, lavata 3 volte con acqua distillata ed addizionata di solfato di sodio anidro, infine filtrata.

Si ottengono circa 90 g di CLA al 70 % c.a. che, all'analisi cromatografica degli esteri metilici rivelano la seguente composizione in acidi grassi:

20

acidi 9c,11t- 8c,10t- ottadienoici	30,90 %
acidi 11c,13t- 10t,12c- ottadienoici	32,05 %
acidi 11t,13c- 8c,10c- 9c,11c- ottadienoici	1,55 %
acido 10c,12c-ottadienoico	0,65 %
25 acido 11c,13c-ottadienoico	0,15 %
acidi 11t,13t , 9t,11t- 10t,12t- 8t,10t- ottadienoici	4,05 %
acidi grassi C16 e C18, saturi e monoinsaturi	30,65 %

Esempio Preparativo II – Sintesi di CLA da olio di girasole in glicerina

30 Il procedimento dell'Esempio Preparativo II è ripetuto su 100 g di olio di semi di girasole, ottenendo circa 90 g di CLA al 60% c.a. che, all'analisi cromatografica degli

esteri metilici rivelano la seguente composizione in acidi grassi:

	acidi 9c,11t- 8c,10t- ottadienoici	26,50 %
	acidi 11c,13t- 10t,12c- ottadienoici	29,40 %
5	acidi 11t,13c- 8c,10c- 9c,11c- ottadienoici	1,65 %
	acido 10c,12c-ottadienoico	0,65 %
	acido 11c,13c-ottadienoico	0,30 %
	acidi 11t,13t , 9t,11t- 10t,12t- 8t,10t- ottadienoici	4,00 %
	acidi grassi C16 e C18, saturi e monoinsaturi	38,05 %

10

Esempio Preparativo III – Sintesi di CLA da olio di girasole in dietilenglicole

Il metodo di Nichols P.L. et al. (JAOCS, 73, 247-252, 1951) è stato applicato su 100 g di olio di vinacciolo, ottenendo circa 90 g di CLA al 70% c.a.

15 Tuttavia alcune varianti sono state introdotte, ad esempio la temperatura di reazione mantenuta a 220°C per 3 ore, ed il prodotto non è sottoposto a metilazione, se si eccettua l'aliquota necessaria a verificare la composizione in acidi grassi, che risulta essere:

	acidi 9c,11t- 8c,10t- ottadienoici	29,60 %
	acidi 11c,13t- 10t,12c- ottadienoici	31,50 %
20	acidi 11t,13c- 8c,10c- 9c,11c- ottadienoici	1,60 %
	acido 10c,12c-ottadienoico	0,45 %
	acido 11c,13c-ottadienoico	0,25 %
	acidi 11t,13t , 9t,11t- 10t,12t- 8t,10t- ottadienoici	5,10 %
	acidi grassi C16 e C18, saturi e monoinsaturi	31,50 %

25

Esempio IV – Sintesi del trigliceride di CLA da olio di ricino

4 g di olio di ricino sono sciolti in 30 ml di piridina, si aggiungono quindi 3,15 g di tosil cloruro, lasciando sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore.

30 Quindi si aggiungono 60 ml di acqua e 20 ml di etere di petrolio. Si lava la fase organica con 2x30 ml di acido acetico diluito, 3x30 ml di acqua e 10 ml di salamoia, quindi si svapora sotto vuoto, ottenendosi circa 5 g di olio di ricino tosilato.

Si scioglie il tosilato in 10 ml di toluene, e si aggiungono 3,5 g di DBU (diazabicycloundecene) scaldando per 5 ore a 95° C. Quindi si versa in 50 ml di acqua sotto agitazione, e quindi si aggiungono 10 ml di etere di petrolio, procedendo ai lavaggi con acido acetico, acqua e salamoia come nel caso precedente.

- 5 Si ottengono circa 2,7 g di olio giallo-bruno che risulta formato da trigliceride di CLA al 87 % di purezza, come illustrato dalla seguente analisi cromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi:

	acido 9c,11t-ottadienoico	69,55 %
10	acido 9c,11c-ottadienoico	19,51 %
	acidi grassi C16 e C18, saturi e monoinsaturi	10,94 %

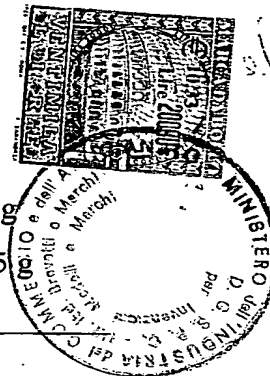
- 15 NB La metodica descritta nell'esempio è passibile di numerose migliorie nell'applicazione industriale. Si citano come esempi le seguenti sostituzioni: a) di tosil cloruro con mesil cloruro; b) della piridina come solvente-catalizzatore con DMAP (dimetilamminopiridina) o similari (ad esempio 4-(2-imidazolidinil)-piridina)) in quantità catalitica (1:10 equivalenti) in soluzione di THF, toluene o altro solvente industriale; c) della doppia sequenza di lavaggi utilizzata con un unico lavaggio finale in continuo in centrifughe industriali appositamente preposte; ecc.

20 Esempio Applicativo I – Capsule di gelatina molle

Capsule di gelatina molle sono preparate con procedimento farmaceutico. Ciascuna capsula da 1,35 g contiene:

	Capsula (A)	Capsula (B)	Capsula (C)
25			
	CLA trigliceride dall' Esempio		
	Preparativo IV	-	0,8 g
	Acidi grassi di soia	0,99 g	0,19 g
30	alfa-Tocoferolo	0,01 g	0,01 g
	beta-Carotene	-	0,05 g
	Acido alfa-lipoico	-	0,25 g

	13		
Cera d'api	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Gelatina	0,25 g	0,25 g	0,25 g



Esempio I – Studio clinico dello stato perossidativo del plasma per somministrazione di

5 CLA e associazione CLA+antiossidanti

Sono scelti 6 soggetti volontari, suddivisi in 3 coppie, a ciascuna delle quali viene consegnata una confezione di 60 capsule del tipo (A), (B) e (C), con la posologia di 3 capsule pro die. I soggetti sono inoltre istruiti per non alterare il loro modello tipico di attività fisica e di alimentazione.

10 A intervalli di 0, 5, 10 e 20 giorni dall'assunzione viene monitorato lo stato di lipoperossidazione plasmatica mediante il d-ROMs kit test (Gallarati-IRAM srl, Parma, Italia).

15 In breve, 40 ul di sangue sono presi per puntura al dito a 0, 10, e 20 giorni del trattamento orale. L'analisi è condotta immediatamente dopo il campionamento, il capillare da 40 ul è posto in 3,92 ml di soluzione di tampone acetato a pH 4.8 contenente 40 ul of N,N-dietil-para-fenilendiammina. Dopo dissoluzione e aggiunta di una goccia di soluzione enzimatica, il campione è centrifugato a 3000 rpm per 3 minuti, quindi posto in una cuvetta e scaldato temperatura costante per 3 minuti, quindi l'assorbanza è misurata a 505 nm. I risultati sono illustrati in Tabella I.

20 TABELLA I

Confronto del livello lipoperossidativo

		Valore medio al giorno 0 (*)	Valore medio al giorno 10 (*)	Valore medio al giorno 20 (*)
25	Soggetti con capsule (A)	227	235	221
	Soggetti con capsule (B)	216	295	342
	Soggetti con capsule (C)	231	246	238

30 (*) Lo stress ossidativo è espresso come Unità Carratelli (U. Carr.), dove 1 U.Carr. equivale approssimativamente alla concentrazione di 0,08 mg % di perossido di idrogeno.

I livelli di lipoperossidazione misurati sui soggetti trattati con l'associazione

CLA+antiossidanti si mantengono entro valori fisiologici, a differenza dei soggetti trattati con solo CLA.

Si evidenzia, dunque, un possibile vantaggio del metodo di trattamento combinato in grado di apportare, nel medio-lungo termine, i benefici biologici tipici del CLA senza gli

Esempio II – Attività lipolitica in vitro

L'attività lipolitica comparativa è misurata con le metodiche di Chernick et al, (J. of Lipid Research, 27, 266-294, 1986), Hirsch et al., (J. of Lipid Research, 25, 665-677 (1984) e Kawamura et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 732-736, 1981).

In breve, delle culture di fibroblasti 3T3-L1 da embrione di topo sono cresciute in 90% DMEM con 4,5 g/l D-glucosio e L-glutamine, 10% siero bovino fetale e 1% di liquido antibiotico/antimicotico (100x), incubate a 37°C con 5% CO₂, 95% aria, quindi 0,5% Tripsina-EDTA. Le vengono centrifugate e poi risospese in 1 ml di di 90% DMEM, 5% FBS e 10% DMSO in fiale criogene e sterili. I risultati sono illustrati nella Tabella II.

TABELLA II

Misurazione dell'effetto lipolitico di CLA ed sostanze lipolitiche

Sostanza	Concentrazione (g/100 ml)	% Aumento rispetto al controllo
controllo	-	1,0
Isoproterenolo	0,0001	7,8
CLA	0,1	1,4
CLA:caffeina (mix 1:1 p:p)	0,1	3,2
Caffeina	0,1	2,2

La sperimentazione mostra che il CLA ha un'attività lipolitica inferiore alla caffeina alla stessa concentrazione, ma la combinazione delle due sostanze ha un comportamento sinergico.

Sebbene il CLA sia meno attivo dell'isoproterenolo, il suo uso è preferito per l'assenza degli effetti collaterali tipici di tale farmaco.

C. G. G. G.

Esempio Applicativo II – Crema per il corpo

Emulsioni o/a si preparano mescolando sotto agitazione gli ingredienti della fase oleosa ed acquosa scaldate separatamente a 75° C. 100 g di ciascuna emulsione contiene:

5		Emulsione (A)	Emulsione (B)	Emulsione (C)
Fase oleosa				
	CLA libero dall' Esempio Preparativo II	-	1,7 g	1,7 g
10	Acidi grassi da soia	1,7 g	-	-
	Poligliceril-2-sesquistearato	1,0 g	1,0 g	1,0 g
	Cera d' api	0,3 g	0,3 g	0,3 g
	Stearato di magnesio	0,5 g	0,5 g	0,5 g
	Stearato di alluminio	0,5 g	0,5 g	0,5 g
15	Olio di ricino idrogenato 7-poliossietilene	2,0 g	2,0 g	2,0 g
	Olio minerale a bassa viscosità	10,0 g	10,0 g	10,0 g
	Metil p-idrossibenzoato	0,1 g	0,1 g	0,1 g
	Acido 18-beta-glicirretico	1,0 g	1,0 g	1,0 g
	Tocoferil acetato (vitamina E acetato)	0,5 g	0,5 g	0,5 g
20	BHT	0,3 g	0,3 g	0,3 g
Fase aquosa				
	Acido glicolico	3,0 g	3,0 g	3,0 g
	Estratto di matè (titolo in caffeina 7%)	-	-	2,0 g
25	Estratto di matè decaffeinato	2,0 g	2,0 g	-
	Acido ascorbico (vitamina C)	0,01 g	0,01 g	0,01 g
	Acqua deionizzata q.b.	a 100 g	a 100 g	a 100 g

Esempio II – Studio clinico di attività anticellulitica per applicazione topica di CLA e associazione CLA+xantina

30

Sei soggetti di sesso femminile sono precedentemente valutati in base all'entità del fenomeno cellulitico nella zona osterolaterale nella posizione dell'arto inferiore flessa a

90°, classificata secondo i seguenti parametri.

0	assenza di cellulite
1	piccoli ponfi o avvallamenti cutanei
5 2	piccoli ponfi e strie
3	noduli pronunciati e strie
4	tutti i fenomeni precedenti in presenza di consistenti rilievi nodulari duri

10 Sono scelti 6 soggetti con gradi di cellulite pari a 1 o 2 che presentano simmetria bilaterale tra la coscia sinistra e quella destra.

I soggetti volontari sono suddivisi in 3 coppie, a ciascuna delle quali viene consegnata una crema - l'Emulsione A, B, e C dell'Esempio Applicativo - con l'istruzione di applicarla 2 volte al giorno, alla sera e alla mattina, esclusivamente sull'area della coscia destra mediante massaggio lieve. I soggetti sono stati istruiti per non alterare il loro modello tipico di attività fisica e di alimentazione.

A due mesi dall'applicazione, vengono controllati i parametri fondamentali, indicati da Smith WP (Cosmetics & Toiletries, 61-70, Luglio 1995), confrontando la coscia destra con quella sinistra. I risultati sono illustrati di seguito dalla Tabella III.

TABELLA III

Confronto delle proprietà anticellulitiche

	Soggetti con Emulsione (A)	Soggetti con Emulsione (B)	Soggetti con Emulsione (C)
25 Diametro della coscia	-1%	-5%	-8%
Spessore dello strato adiposo	-3%	-18%	-24%
Miglioramento soggettivo	+10%	+33%	+50%
Classificazione clinica	+2%	+30%	+30%
30 Fermezza cutanea:	+5%	+10%	+15%
Reazioni irritativa	1	0	2

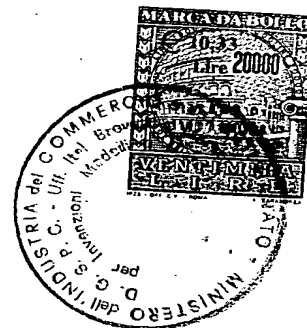
Chen

Idratazione della pelle	+25%	+13%	+24%
Levigatezza della superficie	+14%	+21%	+37%

5 La composizione contenente CLA risulta efficace nel migliorare la condizione cellulitica, e significativamente più efficace in combinazione con caffeina 2%.

Si e' in pratica constatato come la presente invenzione raggiunga gli scopi prefissati. E' evidente che le composizioni e i metodi secondo l'invenzione sono suscettibili di varianti nell'ambito del concetto inventivo.

10 Lo scopo dell'invenzione e' meglio definito dalle rivendicazioni, piuttosto che dagli esempi sopra riportati..



RIVENDICAZIONI

1. Procedimento di preparazione di acido linoleico coniugato (CLA) caratterizzato dal fatto di operare la reazione con i reagenti (a), (b), e (c), dove :
 - 5 a) è un olio vegetale con contenuto di acido linoleico non inferiore a 60%;
 - b) è glicerina;
 - c) è un idrossido alcalinodetto procedimento effettuato a temperatura tra 200 e 240 °C per 2-8 ore, seguito da neutralizzazione con acidi minerali acquosi, separazione per decantazione o per
10 centrifugazione della fase oleosa, e recupero di detto CLA, opzionalmente sottoposto a filtrazione, essiccamento, deodorizzazione o chiarificazione.
2. Procedimento di preparazione di CLA secondo la Rivendicazione 1 nel quale il reagente (a) è scelto tra l'olio di vinacciolo, di carcamo, di girasole, di mais, e loro miscele.
3. Procedimento di preparazione di CLA secondo la Rivendicazione 1 nel quale il
15 rapporto ponderale tra glicerolo (b) e olio vegetale (a) è compreso tra 0,5:1 e 4:1.
4. Procedimento di preparazione di CLA secondo la Rivendicazione 2 nel quale l'idrossido alcalino (c) è soda caustica, potassa caustica, o miscele di questi, in rapporto stechiometrico da 1:1 a 5:1 rispetto all'olio vegetale (a).
5. CLA in forma di acido libero o suo sapone (sale metallico) ottenuto mediante un
20 procedimento secondo le Rivendicazioni 1-4.
6. CLA in forma di acido libero o suo sapone (sale metallico) ottenuto a partire da olio di semi di vinacciolo mediante isomerizzazione alcalina.
7. Procedimento di preparazione di trigliceride di CLA mediante trattamento con ammine terziarie dell'olio di ricino avente i residui 12-idrossioleici collegati a un gruppo
25 aril- o -alchil solfonico.
8. Procedimento secondo la Rivendicazione 7 nel quale il gruppo solfonico è il tosilato, il mesilato o il triflato.
9. Procedimento secondo la Rivendicazione 8 nel quale le ammine terziarie sono scelte nel gruppo comprendente piridina, diazabicycloundecene, 4-N,N-dimetilammino-
30 piridina, 4-(2-imidazolidinil)-piridina, e loro miscele.
10. CLA in forma di trigliceride ottenuto mediante un procedimento secondo le

Carla Azzi

Rivendicazioni 7-9.

11. Metodo per migliorare lo stato di benessere corporeo mediante somministrazione orale di una preparazione dietetica contenente i seguenti componenti:

- a) CLA in forma di acido libero o trigliceride, in quantità compresa tra 0,01 e 50% in peso della preparazione;
- b) Antiossidanti dieteticamente accettabili, in rapporto ponderale antiossidante:CLA compreso tra 1:2 e 5:1;
- c) Nutrienti ed eccipienti dieteticamente accettabili, per la restante parte della preparazione.

12. Preparazione dietetica secondo la Rivendicazione 11 dove gli antiossidanti (c) sono sostanze nutrizionali contenute nei semi, nelle foglie, nei fiori e nella corteccia di frutta e vegetali, di origine estrattiva da fonti naturali o gli equivalenti di provenienza sintetica.

13. Preparazione dietetica secondo la Rivendicazioni 11 e 12 dove le sostanze nutrizionali antiossidanti sono scelte nel gruppo comprendente istidina, valina, armadendrina, morina, quercetina, esperetina, naringenina, chempferolo, apigenina, luteolina, fisetina, fustina, rutina, miricetina, pelargonidina, cianidina, delphinidina, catechina, epicatechina, gallocatechina, proantocianosidi, isomeri del carotene, licopene, zeaxantina, retinolo, cataxantina, alfa- beta- e gamma-tocoferolo, acido gallico, propil gallato e esteri gallici, acido tannico, lecitina da uovo e da soia, acido L-ascorbico ed esteri, acido lattico, acido citrico, acido L-tartarico, polichetidi da rosso di Monascus, cardanolo, cardolo, acido anacardico, orizanolo, olio di anacardio, acido tioidipropionico ed estere laurilico (DLTBP), acido alfa-lipoico, acido nordiidroguaiaretico (NDGA), guaiacolo, idrossitirosolo, oleuropeina, verbascoside), fenoli da rosmarino, chiodi di garofano, peperoncino, cannella, zenzero, paprika (TBHQ), oli agrumari, triidrossibutirrolfenolo (THBP), BHT e BHA, maclurina, etossichina, acido ellagico, musizina, boldina, i loro corrispondenti glicosidi, esteri ed eteri, e loro combinazioni.

14. Preparazione dietetica secondo la Rivendicazione 11-13 in forma di capsula, compressa, soluzione alcolica, emulsione, alimento per l'infanzia, prodotto lattiero-caseario, integratore per l'attività sportiva, o altro formulato destinato all'alimentazione umana.

Corallini

15. Metodo per il trattamento della cellulite mediante applicazione topica di CLA in forma di acido libero, di un suo sale metallico o di trigliceride, in concentrazione da 60 a 90% in peso del totale degli acidi grassi.
- 5 16. Metodo per il trattamento della cellulite mediante applicazione topica di una composizione cosmetica contenente CLA in forma di acido libero, di un suo sale metallico o di trigliceride.
17. Composizione cosmetica secondo la Rivendicazione 16 in forma di una crema, gel, lozione, o spray, detta composizione contenente CLA in quantità da 0,5% a 90% in peso, ed uno o più ingredienti cosmeticamente accettabili da 10% a 99,5% in peso.
- 10 18. Composizione cosmetica secondo la Rivendicazione 17 contenente inoltre una o più sostanza antiossidante di uso cosmetico.
19. Composizione cosmetica secondo le Rivendicazioni 16 e 17 contenente inoltre una o più sostanza vegetale ad attività anticellulitica.
- 15 20. Composizione cosmetica secondo la Rivendicazione 19 dove detta sostanza vegetale ad attività anticellulitica è scelta nel gruppo comprendente gli estratti di Centella asiatica, di Hibiscus Abelmoschus, di Polygala tenuifolia, di Platycodon grandiflorum, di Hibiscus abelmoschus, di Kochia scoparia, di edera, l'inositol fosfato, l'acido fitico, i ginsenosidi, l'escina, la caffeina, la teofillina, o miscele di questi.

